

(10)

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年1月31日 (31.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/08756 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04811

(22) 国際出願日: 2001年6月7日 (07.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-221248 2000年7月21日 (21.07.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): マルハ  
株式会社 (MARUHA CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-

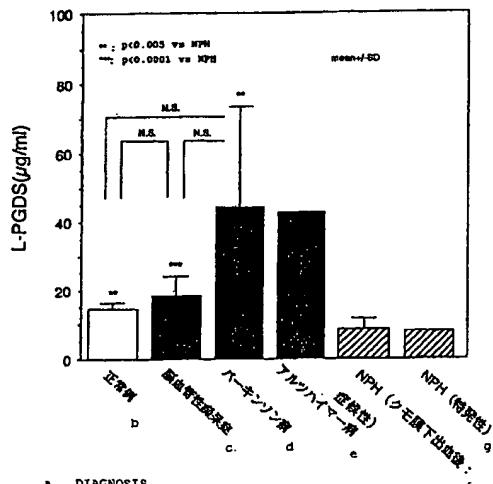
8608 東京都千代田区大手町1丁目1番2号 Tokyo (JP).  
科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉  
県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP). 財団法人 大  
阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE  
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府吹田市古江台  
6丁目2番4号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 間瀬光人 (MASE, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒465-0055 愛知県名古屋市名東区  
勢子坊1-1101 Aichi (JP). 中右博也 (NAKAU, Hiroya) [JP/JP]; 〒565-0851 大阪府吹田市千里山西6-62-1014  
Osaka (JP). 乾 隆 (INUI, Takashi) [JP/JP]; 〒651-  
1322 兵庫県神戸市北区東有野台3丁目2-19 Hyogo (JP). 江口直美 (EGUCHI, Naomi) [JP/JP]; 〒533-0005

[締葉有]

(54) Title: METHOD OF DIFFERENTIATING DEMENTING DISEASES

(54) 発明の名称: 痴呆性疾患の鑑別方法



a...DIAGNOSIS  
b...NORMAL CASE  
c...CEREBROVASCULAR DEMENTIA  
d...PARKINSON'S DISEASE  
e...ALZHEIMER'S DISEASE  
f...NPH (POST-SUBARACHNOIDAL BLEEDING: SYMPTOMATIC)  
g...NPH (IDIOPATHIC)

(57) Abstract: A method of differentiating dementing diseases characterized by measuring the concentration of human lipocalin-type prostaglandin D synthase in a bodily liquid sample collected from a subject; and a kit for differentiating dementia diseases containing an antibody specific to human lipocalin-type prostaglandin D synthase.

(57) 要約:

WO 02/08756 A1

本発明は、被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグラン  
ジンD合成酵素濃度を測定することを特徴とする、痴呆性疾患の鑑別方法及びヒ  
トリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な抗体を含む痴呆性疾患  
の鑑別用キットに関する。



大阪府大阪市東淀川区瑞光1-8-7 Osaka (JP). 裏出良博  
(URADE, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒604-8227 京都府京都市  
中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町 440-706 Kyoto (JP).  
清木興介 (SEIKI, Kosuke) [JP/JP]. 織田浩司 (ODA, Hi-  
roshi) [JP/JP]. 中島 浩 (NAKAJIMA, Hiroshi) [JP/JP].  
佐藤信行 (SATO, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒300-4295 茨城  
県つくば市和台16-2 マルハ株式会社 中央研究所内  
Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 杉本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒  
100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手  
町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイド」を参照。

## 明細書

## 痴呆性疾患の鑑別方法

技術分野

5 本発明は、痴呆性疾患の鑑別方法に関し、さらに詳しくは、被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリーン型プロスタグランジンD合成酵素（以下においてL-PGDS ということもある）濃度を測定することを特徴とする痴呆性疾患の鑑別方法及び前記方法に用いる鑑別用キットに関する。

10 背景技術

社会の高齢化に伴い、痴呆性疾患患者は増加の一途を辿っている。痴呆性疾患は、非常に多彩な病因により惹起され、正確な鑑別診断は非常に難しく、また多くの痴呆性疾患の治療法もまだ確立されていない。そのような痴呆性疾患の中でも、正常圧水頭症（normal pressure hydrocephalus、以下 NPH）は、クモ膜下出血や髄膜炎に続発して発症する症候性正常圧水頭症と、原因不明の特発性正常圧水頭症を含み、外科手術（脳室腹腔短絡術など）により劇的に改善されることが知られている。しかし、アルツハイマー病、パーキンソン病又は脳血管性痴呆等といった高齢者に認められる痴呆性疾患、あるいはびまん性脳損傷の患者においては、脳の萎縮が認められ、脳室も拡大していることから、外科手術による改善を期待することは難しい。そこで外科手術による改善の見込まれる NPH と改善の見込まれない痴呆症とを早期に鑑別する必要があるが、この鑑別はしばしば困難である。

これまで手術適応を確定するために行われてきた診断方法としては、古典的には、腰椎などから脳脊髄腔ヘドレナージを置き脳脊髄液圧を終日持続測定することにより、脳脊髄液の圧波を見る方法がある（Symon, L., Dorsh, N.W.C, J. Neurosurg., 42: 258-273, 1975）。しかし、この方法では、患者のベッド上での安静、清潔な環境、持続測定解析装置等を必要とし、臨床上困難である場合が多い。また、連日脳脊髄液を 40～50ml 排除し、症状の改善を見る方法もあるが、確実性に欠け、繰り返し穿刺された部位からの感染等の合併症併発の危険性を伴う。さ

らに、萎縮を伴うアルツハイマー型老人性痴呆と NPH を鑑別するために脳静脈血中のアミロイド関連蛋白 ( $\alpha$ 1-antichymotrypsin) を調べる方法が報告されているが、脳静脈の採血が侵襲を伴う上に、成績もそれほど上がらず、普及しているとはいえない。

5 髄液の動態を見る方法は、この疾患群の病態生理からみても合理的な方法といえるが、最近では、髄液の圧波を測定するよりも画像診断の進歩が著しい。腰椎から脳脊髄液腔に造影剤を注入し、RI または CT 脳槽造影を行い、髄液の循環吸収障害を評価する方法が従来の一般的な方法であったが、この診断方法も、手術予後と必ずしも相関しないことが報告されている。比較的新しい報告としては、

10 MRI画像を利用して、中脳水道の髄液の流れを評価する方法がある (Mase, M. et al, Current Treatment for Hydrocephalus (Tokyo), 8: 13-18, 1998)。これは侵襲を伴わない方法として注目されるが、現状では発展途上であり、また、有効でない症例もある。さらに、この方法を施行できる施設は限られていることから、広く普及するまでには至っていないのが現状である。

15 最近の研究の成果の中では、脳脊髄液中の neurofilament triplet protein (NFL)、あるいは glial fibrillary acidic protein (GFAP) により神経組織の障害程度を調べることにより NPH を検出する方法も報告されている (Tullberg, M. et al, Neurology 60: 1122-1127, 1998) が、未だ実用化されていない。

以上のように、NPH は手術療法が有効であるにも関わらず、早期に手術すべき 20 かどうかを決定するための検出方法がいまだ確定されていないのが現状である。

一方、プロスタグランジンD合成酵素 (PGDS) には、主として脳に局在するリポカリン型と脾臓やマスト細胞に存在する造血器型があり、脳脊髄液中に見出されるタンパク質のPDGSはリポカリン型であると同定されている。リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) は種々の哺乳動物の中枢神経系 (CNS) におけるプロスタグランジンD<sub>2</sub>の生合成を行う酵素である。この酵素は、脳の軟膜 (leptomeninges)、クモ膜 (arachnoid membrane) で主として産生され、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: 以下においてCSFということもある) に分泌される。近年、このL-PGDSが、CSF中に多量に存在することが知られていた  $\beta$  トレースと同一であることが明らかにされた (Hoffmann A et al., J. Neurochem., 61:451-456,

1993; Zahn M. et al., *Neurosci. Lett.*, 154:93-95, 1993; Watababe, K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203:1110-1116, 1994)。βトレースはヒトCSFタンパク質の主要な構成成分であるので、様々な中枢神経系疾患におけるこのタンパク質の臨床上の用途が研究されてきた。しかしながら、現在のところ、PGDS

5 あるいはL-PGDSの各種痴呆性疾患への関与及び役割は解明されていない。

本発明の課題は、これまでの種々の検査手段では検出することができなかつたか、あるいは確実な検出が困難であった正常圧水頭症を、正確に且つ被験者の負担が少なく鑑別することのできる方法を提供することにある。更に、前記鑑別方法に使用するキットを提供することにある。

10

#### 発明の開示

本発明者らは上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、脳脊髄液、血液、又は尿等の体液中の L-PGDS 濃度を測定し、その測定値を指標とすることより、痴呆性疾患の鑑別を行えることを見い出し、本発明を完成させるに至った。

15

即ち、本発明は、被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリーン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定することを特徴とする、痴呆性疾患の鑑別方法を提供する。本発明はまた、ヒトリポカリーン型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な抗体を含む痴呆性疾患の鑑別用キットを提供する。

20

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、正常例、クモ膜下出血後 NPH および特発性 NPH、脳血管性痴呆症、パーキンソン病、アルツハイマー病の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度の測定結果を示す図である。

25

図 2 は、正常例、若年 NPH(y-NPH) および老年 NPH(e-NPH)、痴呆症(Dementia)の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度の測定結果を示す図である。

図 3 は、正常例、若年 NPH(y-NPH) および老年 NPH(e-NPH)、痴呆症(Dementia)の脳脊髄液中の neuron specific enolase (NSE)濃度の測定結果を示す図である。

図 4 は、正常例、若年 NPH(y-NPH) および老年 NPH(e-NPH)、痴呆症(Dementia)の脳脊髄液中の S-100 タンパク質濃度の測定結果を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明において、L-PGDS を測定する試料は、被験者から採取した体液であり、  
具体的には、脳脊髄液、血液又は尿等が挙げられる。上記試料中の L-PGDS 濃度  
5 を測定する方法としては、L-PGDS 濃度を正確に反映する測定法であれば特に限  
定はされず、例えば免疫学的測定法、酵素活性測定法が挙げられる。しかしながら、  
実際の臨床現場において、簡便に且つ多量の試料を同時に測定する必要性の  
観点から、L-PGDS に特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を  
用いた EIA、ELISA、RIA、FIA 等の免疫学的測定法によるのが好適である。

10 上記の免疫学的測定法のうち、特に、L-PGDS 特異的モノクローナル抗体を使  
用したサンドイッチ ELISA 法が好ましく、該モノクローナル抗体としては、具  
体的には、ハイブリドーマ細胞株 1B7 (FERM BP-5709)、7F5 (FERM BP-5711)、  
6F5 (FERM BP-5710)、9A6 (FERM BP-5712)、10A3 (FERM BP-5713)  
より産生される抗体が挙げられる。サンドイッチ ELISA 法による測定に際して  
15 は、既に本発明者らにより確立されている、上記モノクローナル抗体を含む L-  
PGDS 検出キットを利用すればよい (WO97/16461)。なお、それぞれの細胞株  
は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3  
号) にブダペスト条約に基づく国際寄託として寄託されている。

本発明においては、上記手段で測定された L-PGDS 濃度測定値を指標として、  
20 健常者の L-PGDS 濃度又は NPH 以外の痴呆性疾患 (例えば、アルツハイマー病、  
パーキンソン病、血管性痴呆など) の L-PGDS 濃度と比較することにより、NPH  
を鑑別することができる。

本発明の方法により検出され、または鑑別される痴呆性疾患としては、例えば、  
正常圧水頭症 (NPH) であり、これにはクモ膜下出血や髄膜炎に続発して発症す  
25 る症候性正常圧水頭症と、原因不明の特発性正常圧水頭症が含まれる。本発明の  
方法を用いることにより、これらの NPH を正常例から鑑別し、あるいは血管性痴  
呆症、アルツハイマー病又はパーキンソン病といった他の痴呆性疾患と鑑別する  
ことができる。

症候性 NPH および特発性 NPH 等の NPH は、正常例に比して脳脊髄液中 L-PGDS

濃度が有意に低値である。また、血管性痴呆症、アルツハイマー病、パーキンソン病といった他の痴呆性疾患との比較においても、NPH の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度が有意に低値である。正常例と血管性痴呆症、パーキンソン病の間では有意差が認められなかった。

5 また、NPH 患者を 70 歳未満（若年 NPH 群）と 70 歳以上（老年 NPH 群）の 2 群に分けて、各症例の CSF 中 L-PGDS 濃度を測定したところ、老年 NPH 群は若年 NPH 群よりも高い値を示したが、正常群、痴呆群（dementia）（NPH を含まない痴呆症であつて、脳血管痴呆症、パーキンソン病、アルツハイマー病を含む）よりも有意に低く、NPH の鑑別が可能であることが示された。また、若年 10 NPH 群及び老年 NPH 群の髄液中の L-PGDS 濃度はともに、正常群及び痴呆群のいずれと比べても有意に低かった（ $p < 0.005$ ）。

さらに、脳実質障害の指標である neuron specific enolase (NSE) と S-100 タンパク質の CSF 中における濃度をそれぞれラジオイムノアッセイ、イムノラジオメトリック・アッセイで測定した。その結果、各症例の CSF 中の NSE 濃度は、若年 15 NPH 群、老年 NPH 群、正常群、痴呆群の順に高くなっていた。一方、S-100 タンパク質濃度は、正常群、痴呆群、若年 NPH 群、老年 NPH 群の順に高くなっていた。若年 NPH 群の髄液中の NSE 濃度は、痴呆群と比較して有意に低かったが、その他においては各群間に有意差はなかった。また、髄液中の S-100 タンパク質濃度は各群間に有意差はなかった。従って、L-PGDS は NSE や S-100 タンパク質 20 よりも痴呆性疾患の鑑別に有用であることが示された。

本発明者は以下の理論に拘束されるものではないが、NPH において L-PGDS 産生量が減少するのは以下のような理由によるものであろうと考えている。L-PGDS はクモ膜細胞で産生され、髄液中に分泌されているが、クモ膜下出血後や髄膜炎後の NPH では、急性期に起こるクモ膜の炎症性変化によりクモ膜細胞の機能低下 25 または細胞数の減少が起こる。その結果として、L-PGDS の産生が正常例に比べ減少していると考えられる。また、他の痴呆性疾患ではクモ膜の障害や髄液の循環障害は認められないため、NPH ほど L-PGDS の産生が減少していないと考えられる。

本発明の鑑別方法を使用すると、これまでの種々の検査手段では検出すること

ができなかつたか、あるいは確実な検出が困難であった NPH を、正確に且つ被験者の負担が少なく鑑別することができ、外科手術の適否を早期に判断することができる。本発明の鑑別方法をその他の診断方法と組み合わせて用いると鑑別をさらに確実なものとすることができます。

5 本発明はさらに、ヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) に特異的な抗体を含む痴呆性疾患の鑑別用キットを提供する。L-PGDS に特異的な抗体としては、L-PGDS に特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用することができ、好ましくは上述した種々の L-PGDS 特異的モノクローナル抗体を用いることができる。

10 検出法において標識剤として酵素を用いる場合には、本発明のキットは下記の構成試薬を含むことができる。

- (1) 酵素標識化モノクローナル抗体
- (2) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチ ELISA 法を採用すれば、本発明の 15 キットは下記の試薬を含むことができる。

- (1) モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてビオチンーアビジン法を採用すれば、本発明の 20 キットは下記の試薬を含むことができる。

- (1) ビオチン化モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチ ELISA 法及びビオチンーアビジン 25 法を採用すれば、本発明のキットは下記の試薬を含むことができる。

- (1) モノクローナル抗体
- (2) ビオチン化モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体
- (3) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (4) 基質溶液

本発明に使用するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の詳しい作製方法については WO97/16461 に記載の方法を参照されたい。

以下本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何等限定されるものではない。

## 5 実施例

### 参考例：L-PGDS 濃度の測定

体液試料における L-PGDS 濃度を 2 抗体サンドイッチ ELISA 法により測定した。

(1) 標準曲線の作成はまず、L-PGDS と結合可能な抗 L-PGDS モノクローナル抗体 (クローン：7F5) を 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に  $4.4 \mu\text{g/ml}$  になるよう希釈し、96 ウエルマイクロタイプレートに  $300 \mu\text{l}/\text{ウエル}$  ずつ加えて、  
10 4°Cで一晩放置し固相化した。このプレートをリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4、以下 PBS) で 3 回洗浄した後、0.2%カゼインを含む PBS (pH 7.4、以下プロッキング液) を  $300 \mu\text{l}/\text{ウエル}$  加えて 30°Cで 90 分インキュベートし、プロッキングを行った。  
15 次いで、プロッキング後のプレートを 0.05%Tween20 を含む PBS (T-PBS) で 3 回洗浄した後、 $100 \mu\text{l}$  の標準 L-PGDS 溶液 (CSF より純化した L-PGDS をプロッキング液で段階希釈することにより調製) を各ウエルに加え、  
30°Cで 90 分間インキュベートした。反応後、T-PBS で 3 回洗浄し、プロッキング液で  $0.5 \mu\text{g/ml}$  になるよう希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗  
20 PGDS モノクローナル抗体 (クローン：1B7)  $100 \mu\text{l}$  を各ウエルに加え、30°Cで 90 分間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄した後、発色液 (ABTS solution : ベーリンガーマンハイム社製)  $100 \mu\text{l}$  を各ウエルに加え、30°Cで 30 分間インキュベートした後、停止液 (1.5% シュウ酸) を  $100 \mu\text{l}$  ずつウエルに加え、  
25 プレートミキサーで攪拌して反応を停止させた。市販のプレートリーダー (型番 SK601、生化学工業社製) により  $405\text{nm}$  と  $490\text{nm}$  における吸光度の差 ( $A_{405\text{nm}} - A_{490\text{nm}}$ ) を測定し、標準曲線を作成した。

上記サンドイッチ ELISA 法に用いたモノクローナル抗体 (クローン：1B7、7F5) は、マウス腹腔内にプリスタン  $1.0\text{ml}$  を注射し、その後 2 週間目にそれぞれの抗体産生細胞株を  $1 \times 10^8$  個マウスの腹腔内に移植し、2 週間後に腹水を採取

し、得られた腹水をプロテイン A アフィニティカラムクロマトグラフィー操作にかけることにより得た (3~10mg/ml)。尚、上記モノクローナル抗体を産生する細胞株はそれぞれ上記モノクローナル抗体名に一致し、それぞれの細胞株は、  
5 工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、1B7 については FERM BP-5709 (原寄託日平成 7 年 9 月 21 日)、7F5 については FERM BP-5711 (原寄託日平成 8 年 6 月 6 日) の寄託番号で、ブダペスト条約に基づく国際寄託として寄託されている。

(2) 試料中の L-PGDS 濃度の測定は、試料をプロッキング液で適宜希釈して、上記のサンドイッチ ELISA 法に従って L-PGDS 濃度を測定した。

10

実施例 1：正常例、クモ膜下出血後 NPH および特発性 NPH、脳血管性痴呆症 (Dementia)、パーキンソン病、アルツハイマー病の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度の測定

15 眼窩内血腫あるいは頭痛等の症状のみで特にその他異常の認められなかった正常例 6 例、クモ膜下出血後 NPH12 例、特発性 NPH1 例、脳血管性痴呆 3 例、パーキンソン病 12 例、アルツハイマー病 1 例について腰椎より CSF を採取し、CSF 中の L-PGDS 濃度を測定した。

20 各症例の CSF 中 L-PGDS 濃度は、正常例で  $14.58 \pm 1.67$  ( $\mu\text{g/ml}$ 、mean  $\pm$  SD)、クモ膜下出血後 NPH では  $8.51 \pm 3.20$ 、特発性 NPH では  $8.12$ 、血管性痴呆症では  $26.45 \pm 5.67$ 、パーキンソン病では  $44.46 \pm 29.08$ 、アルツハイマー病では  $43.02$  であった。各症例間で有意差検定を行ったところ、クモ膜下出血後 NPH と正常例、クモ膜下出血後 NPH と血管性痴呆、およびクモ膜下出血後 NPH とパーキンソン病の間に有意差が認められた ( $p < 0.005$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.005$ )。正常例と血管性痴呆症、パーキンソン病の間では有意差が認められなかった (図 1)。

25

実施例 2：正常例、若年 NPH および老年 NPH、痴呆症 (Dementia) の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度の測定

正常例 (8 例)、若年 NPH (70 歳未満: 7 例)、老年 NPH (70 歳以: 8 例)、NPH を含まない痴呆症 (脳血管痴呆症 4 例、パーキンソン病 1 例、アルツハイマー病 1 例) の脳脊髄液中 L-PGDS 濃度を測定した。

一病2例を含む7例)について腰椎よりCSFを採取し、CSF中のL-PGDS濃度を測定した。

その結果、各症例のCSF中のL-PGDS濃度は、正常群では $15.70 \pm 2.97$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、mean $\pm$ SD)、若年NPH群では $7.05 \pm 1.69$ 、老年NPH群では $10.04 \pm 3.73$ 、

5 痴呆群では $19.14 \pm 4.34$ であった。図2に示すように、若年NPH群及び老年NPH群の髄液中のL-PGDS濃度はともに、正常群及び痴呆群のいずれと比べても有意に低かった ( $p < 0.005$ )。(図中、y-NPHは若年NPHを、e-NPHは老年NPHを、dementiaはNPHを含まない痴呆症を示す)。

10 実施例3：正常例、若年NPHおよび老年NPH、痴呆症(Dementia)の脳脊髄液中のneuron specific enolase(NSE)とS-100タンパク質濃度の測定

各症例から採取したCSFサンプルを遠心(1500g、10分)し、細胞を含まない上清0.5mLを得て、-20°Cで保存して、脳実質障害の指標であるneuron specific enolase(NSE)とS-100タンパク質を測定した。NSEの測定はNSE測定キット(Eiken, Tokyo, Japan)を用いるラジオイムノアッセイにより、またS-100タンパク質の測定はS-100イムノラジオメトリック・アッセイキット(Sangtec Medical, Sweden)を用いて行った。

その結果、各症例のCSF中のNES濃度は、正常群では $9.90 \pm 3.19$  ( $\text{ng}/\text{mL}$ 、mean $\pm$ SD)、若年NPH群では $6.13 \pm 3.01$ 、老年NPH群では $7.37 \pm 5.42$ 、痴呆群では $11.86 \pm 4.38$ であった(図3)。一方、S-100タンパク質濃度は、正常群では $0.98 \pm 0.38$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、mean $\pm$ SD)、若年NPH群では $3.27 \pm 3.04$ 、老年NPH群では $3.68 \pm 3.61$ 、痴呆群では $1.94 \pm 1.06$ であった(図4)。若年NPH群の髄液中のNSE濃度は、痴呆群と比較して有意に低かったが、その他においては各群間に有意差はなかった。また、髄液中のS-100タンパク質濃度は、各群間に有意差はなかった。

以上の結果から、CSF中L-PGDS濃度を測定することにより、他の指標では検出不能なNPHの検出を正常値との比較から検出できることが明かとなり、更に他の痴呆症とも鑑別できることが明らかになった。

## 請求の範囲

1. 被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) 濃度を測定することを特徴とする、痴呆性疾患の鑑別方法。
- 5 2. 痴呆性疾患が正常圧水頭症に起因するものである請求項1に記載の方法。
3. 正常圧水頭症が症候性正常圧水頭症あるいは特発性正常圧水頭症である、請求項1又は2に記載の方法。
4. 体液が脳脊髄液、血液又は尿である請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. 体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定
- 10 を、免疫学的測定法により行うことを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. 体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体を用いるサンドイッチELISA法により測定する、請求項5記載の方法。
- 15 7. ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な抗体を含む痴呆性疾患の鑑別用キット。

図 1

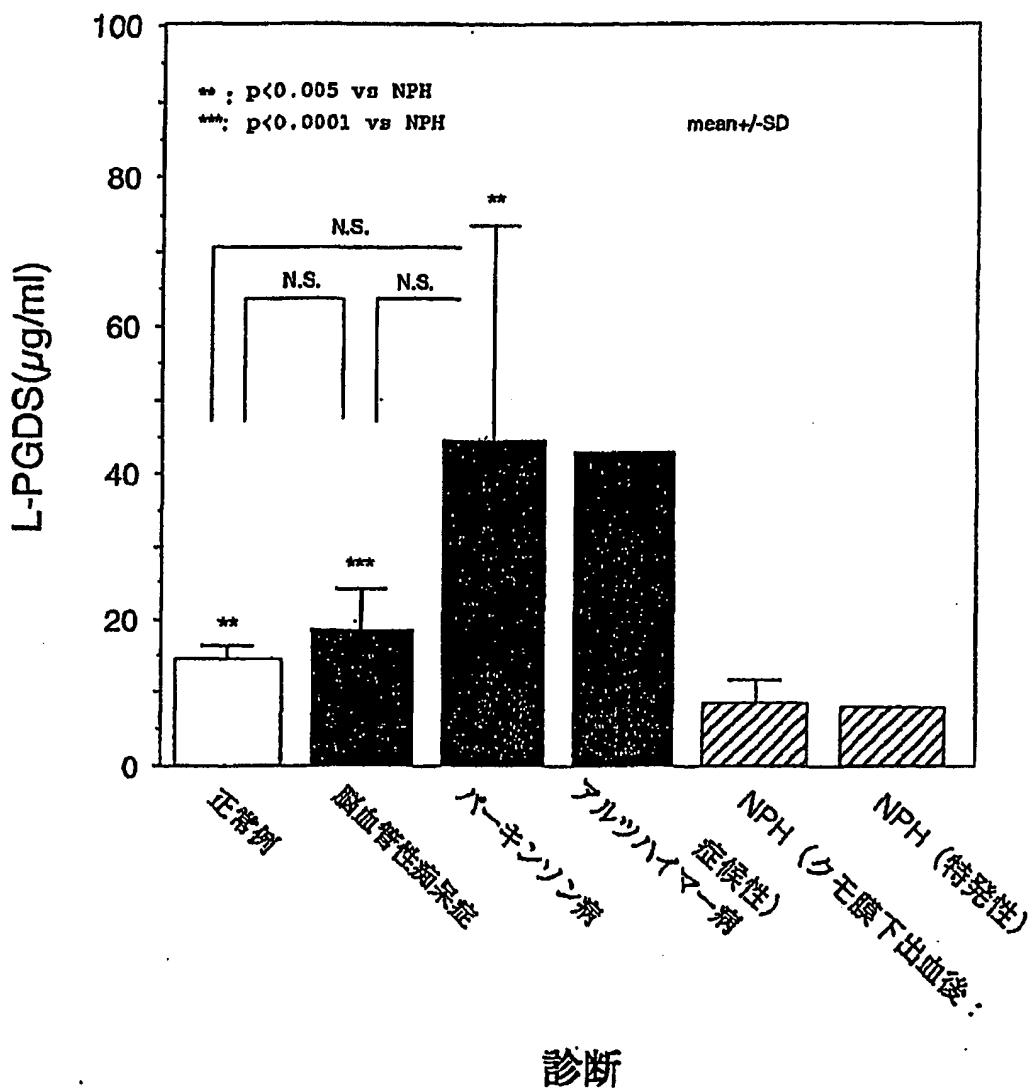


図 2

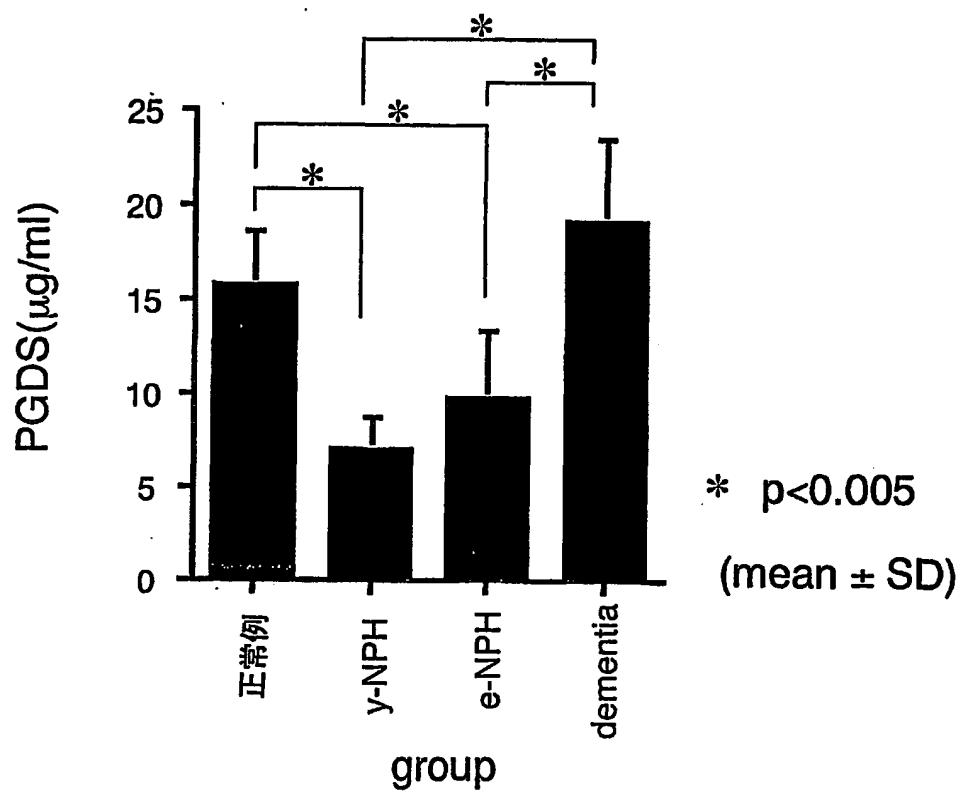


図 3

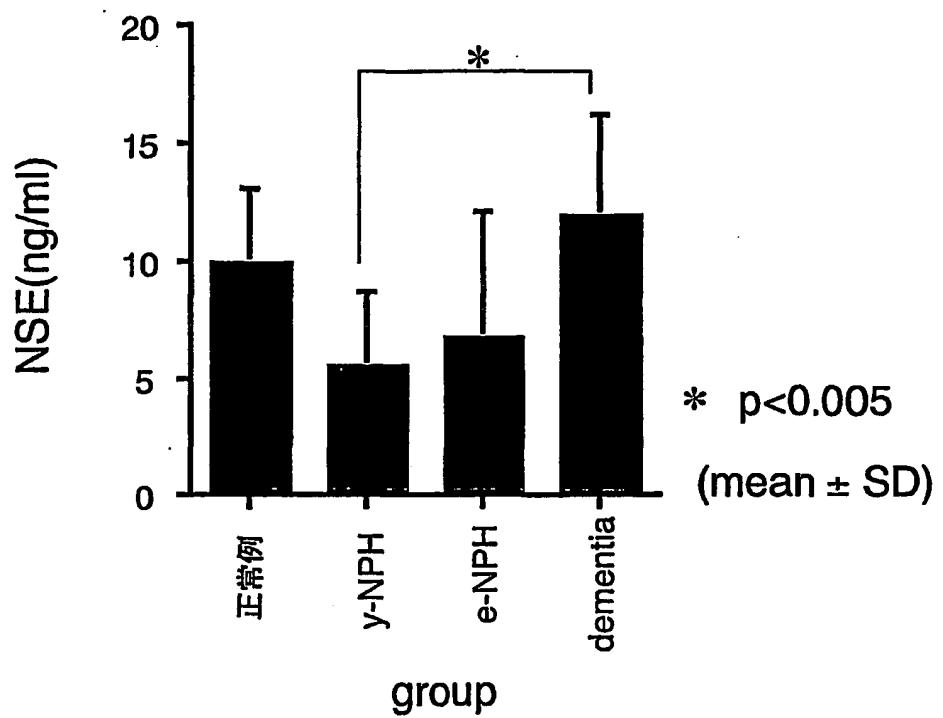
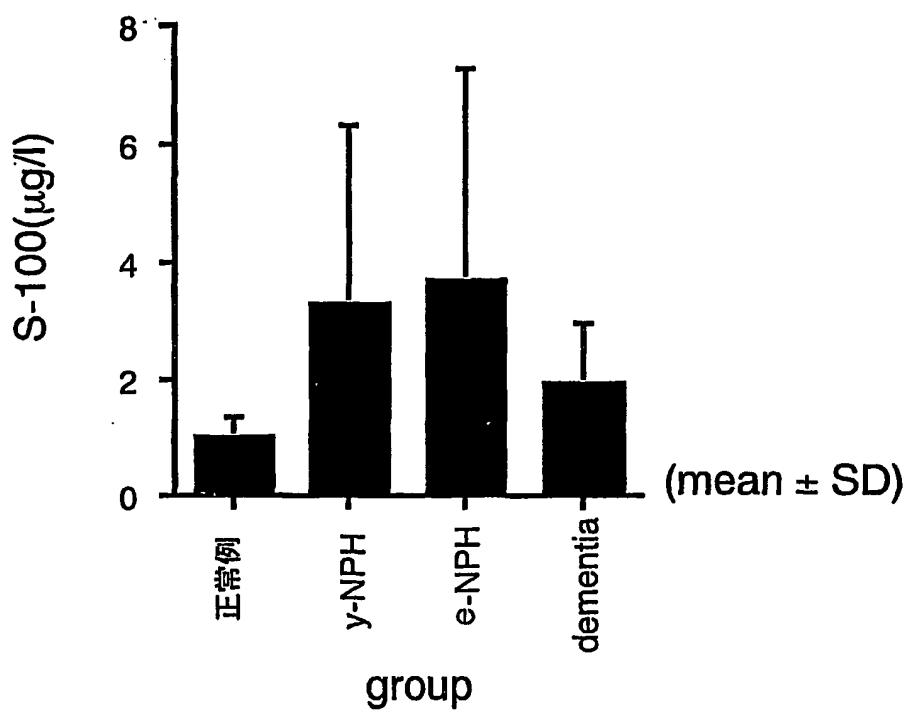


図 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04811

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE on Science and Technology  
CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Atsushi Hiraoka et al., "β-Trace protein (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders", Journal of Analytical Bio-Science, March 31, 2000, Vol.23, No.2, (2000), pages 110 to 116, especially, table 1	1-7
A	WO 99/64621 A (Winthrop-University Hospital), 16 December, 1999 (16.12.99) (Family: none)	1-7
A	Yoshihiro Urade et al., "Postnatal Changes in the Localization of Prostaglandin D Synthetase from Neurons to Oligodendrocytes in the Rat Brain", The Journal of Biological Chemistry, 05 November, 1987, Vol.262, No.31, pages 15132 to 15136	1-7
A	Masayoshi Tachibana et al., "Brain-type prostaglandin D synthetase occurs in the rat cochlea", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, November, 1987, Vol.84, pages 7677 to 7680	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 August, 2001 (07.08.01)Date of mailing of the international search report  
21 August, 2001 (21.08.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/53

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/53

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1992-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST科学技術文献ファイル

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Atsushi Hiraoka et al., $\beta$ -Trace protein(lipocalin-type prostaglandin D synthase) in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders, Journal of Analytical Bio-Science, March 31 2000, vol. 23, no 2(2000), p. 110-116,特に表1	1-7
A	WO 99/64621 A (WINTHROP-UNIVERSITY HOSPITAL), 16.12月.1999(16.12.99), (ファミリーなし)	1-7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

07.08.01

## 国際調査報告の発送日

21.08.01

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

宮澤 浩

2 J 9407



電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Yoshihiro Urade et al., Postnatal Changes in the Localization of Prostaglandin D Synthetase from Neurons to Oligodendrocytes in the Rat Brain, The Journal of Biological Chemistry, November 5. 1987, vol. <u>262</u> , No. 31, p. 15132-15136	1-7
A	Masayoshi Tachibana et al., Brain-type prostaglandin D synthetase occurs in the rat cochlea, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, November 1987, vol. <u>84</u> , p. 7677-7680	1-7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**